

食物中毒

江西省首起误食残托鹅膏有环变种毒蘑菇中毒事件调查与鉴定

刘洋,刘道峰,刘家虹,游兴勇,彭思露,刘成伟,周厚德

(江西省疾病预防控制中心;江西省食源性疾病预防溯源重点实验室,江西南昌 330029)

摘要:目的 调查江西省2019年5月一起误食有毒蘑菇引起的中毒事件,并鉴定引起中毒的有毒蘑菇种类。方法 收集中毒事件的流行病学相关资料进行初步判断,对收集的蘑菇样品进行形态学和分子生物学鉴定。结果 流行病学调查发现患者均食用了自行采摘并煮汤的蘑菇,食量不等,平均潜伏期为2.5 h,出现头晕、恶心、呕吐、四肢麻木等症状,经形态学、分子生物学比对鉴定为残托鹅膏有环变种。结论 本事件为江西省报道的首起因误食残托鹅膏有环变种引起的毒蘑菇中毒事件,结合流行病学、形态学、分子生物学等方法可以鉴定引起毒蘑菇事件的蘑菇种类,提示江西省毒蘑菇中毒形势依然严峻,相关部门应加强防控。

关键词:残托鹅膏有环变种;毒蘑菇;分子鉴定;食物中毒

中图分类号:R155 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2020)03-0334-05

DOI:10.13590/j.cjfh.2020.03.022

Investigation and identification of the first mushroom poisoning case caused by Amanita sychnopyramis f. subannulata in Jiangxi

LIU Yang, LIU Daofeng, LIU Jiahong, YOU Xingyong, PENG Silu, LIU Chengwei, ZHOU Houde
(Jiangxi Province Key Laboratory of Diagnosing and Tracing of Foodborne Disease,
Jiangxi Provincial Center for Disease Control and Prevention, Jiangxi Nanchang 330029, China)

Abstract: Objective To investigate and identify a case caused by mushroom poisoning in May 2019 in Jiangxi Province. **Methods** The case was studied with the epidemiological information, clinical data, and suspicious mushroom samples were identified by morphological and molecular studies. **Results** The epidemiological information showed that all the patients had eaten different quantity of mushrooms which were picked and boiled by themselves, the average incubation period was 2.5 hours, and the symptoms of dizziness, gastrointestinal discomfort, vomiting, numbness of limbs and so on had existed orderly of the patients. The morphological and molecular studies identified the samples were Amanita sychnopyramis f. subannulata. **Conclusion** The incident was the first reported case caused by Amanita sychnopyramis f. subannulata in Jiangxi Province. The poisonous mushroom species can be identified combined with epidemiology, morphology and molecular studies. The situation of s mushroom poisoning in Jiangxi Province is still serious and the relevant departments should strengthen prevention and control.

Key words: Amanita sychnopyramis f. subannulata; mushroom poisoning; molecular identification; food poisoning

毒蘑菇又称毒蕈,是大型真菌子实体,人或畜禽食用后会产生中毒反应。江西省是我国野生蘑菇资源较为丰富的省份,也是蘑菇中毒事件发生较多的省份之一,几乎每年都有因误食毒蘑菇引起中毒甚至死亡的事件发生^[1]。本研究对2019年5月发生在江西省赣州市宁都县的一起

神经毒性毒蘑菇中毒事件进行了调查,并对引起中毒的样品进行了形态学、分子生物学等方面的分析。

1 材料与方法

1.1 主要仪器与试剂

PCR仪(德国Eppendorf),凝胶成像系统(美国Bio-Rad),离心机。

DNA提取试剂盒 Dneasy plant Mini Kit(美国Qiagen),2×Taq PCR Master Mix(日本Takara),琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒(中国天根),Gel-Red(美国Biotium),引物由上海英潍捷基贸易有限公司合成。

收稿日期:2020-02-07

基金项目:江西省科技计划项目(20171BCD40021);江西省卫健委科研项目(20201834,20204844)

作者简介:刘洋 男 主管技师 研究方向为食品安全风险监测

E-mail:cpuprotein@163.com

通信作者:周厚德 女 主管技师 研究方向为食品安全风险监测

E-mail:279190559@qq.com

1.2 方法

1.2.1 流行病学调查

2019年5月10日,赣州市宁都县某村发生一起村民一家5口因进食自采野生蘑菇导致中毒的事件,当地疾病预防控制机构工作人员采用描述性流行病学方法对事件开展了现场流行病学调查,包括对事件核实,向临床医生了解临床表现、诊断和治疗情况,询问患者及亲属可疑蘑菇采集、加工、进食情况,前往中毒患者采集蘑菇地点采集可疑毒蘑菇样品并经过患者确认。

1.2.2 形态学鉴定

将采集的野生蘑菇样品与书籍、网络上类似的蘑菇形态描述以及图片进行形态学比对,通过分析菌盖直径和颜色、表面特征,菌褶的颜色、疏密程度,菌柄的长度、直径、基底形状等的形态特征进行初步判定^[2]。

1.2.3 分子生物学鉴定

将-20℃冻存的野生毒蘑菇取出,用粉碎机粉碎,用DNA提取试剂盒Dneasy plant Mini Kit进行DNA提取,操作按照试剂盒说明书进行。扩增片段为内转录间隔区(ITS),引物为ITSF(GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG)和ITSR(TCCTCCGCTTATTGATATGC)。构建50 μL PCR反应体系(25 μL 2×Taq PCR Master Mix,5 μL 正反向引物,1 μL 模板DNA,19 μL 水),反应条件:98℃预变性5 min;98℃变性5 s,58℃退火5 s,72℃延伸5 s,40个循环后72℃延伸10 min,4℃保温。5 μL PCR产物电泳后进行胶回收,胶回收过程参考相应试剂盒说明书,将回收产物16℃过夜与PUC19载体进行连接,连接产物转染感受态细胞后通过蓝白斑筛选,白色克隆为阳性克隆。将单克隆过夜培养后送生工生物进行测序^[1]。

1.2.4 DNA序列分析

将测序返回的结果用美国生物技术信息中心(NCBI)的Blast工具进行序列比对,获得ITS匹配度高的分类结果。从GenBank下载部分鹅膏种属毒蘑菇的序列,鹅膏种属毒蘑菇的标准序列从文献中获得^[2],采用MEGA10.1软件构建系统发育树,系统发育树采用neighbor-joining方法进行计算,用Bootstrap对系统树进行检验,1 000次重复。通过对进化树的拓扑结构及其稳定性分析蘑菇样品归到属和种^[3]。

2 结果

2.1 流行病学调查

2.1.1 基本情况

2019年5月10日上午11时,宁都县固厚乡固

厚村某村民(病例1,女,73岁)在家南对面山上砍柴时采摘了一碗(约500 g)野生蘑菇(她认为是当地人称的麻面菇,可食用),中午将野生蘑菇余了一大碗汤供家人食用,此外还进食了油豆腐炒空心菜梗、炒咸鱼、豆腐乳、瘦肉蒸汤。开始用餐人员为其本人、其丈夫(病例2,男,74岁)和孙女(病例3,女,7岁),随后叫其儿媳妇(病例4,女,53岁)和重外孙女(病例5,女,4岁)一同吃野生蘑菇汤,上述所有菜品中只有野生蘑菇汤为5人均食用过。其中孙女食用最多喝了约400 mL(含蘑菇约200 g)蘑菇汤,其儿媳妇食用最少约100 mL(含蘑菇约30 g)蘑菇汤,其本人食用了约200 mL(含蘑菇约50 g)蘑菇汤,其重孙女食用了约200 mL(含蘑菇约120 g)蘑菇汤,其丈夫食用了约200 mL(含蘑菇约100 g)蘑菇汤并喝了一碗酒。就餐过程中5人均无任何不适。就餐0.5 h后,其孙女首先发病,在卫生院就诊时,该村民自己也出现了呕吐等症状,卫生院感觉是集理性野生蘑菇中毒事件,于是让打电话通知其他家属,于是该村民打电话通知了其儿媳妇,儿媳妇回家后发现该村民丈夫、重孙女均已经发病,于是将他们送往卫生院,在送往卫生院的路上,该村民的儿媳妇也出现中毒症状,于是5人发病后均由卫生院转至宁都县人民医院就诊。县医院诊断为毒蘑菇中毒,对患者给予支持治疗并报告了当地疾病预防控制中心,治疗观察4 d后考虑两名儿童和其丈夫病情较为严重,转至赣州市第一附属医院救治。宁都县疾病预防控制中心人员和赣州市第一附属医院人员将调查中获取的可疑蘑菇照片发送给湖南师范大学和江西省疾病预防控制中心专家协助辨识、初步诊断为神经精神型有毒蘑菇残托鹅膏,并将该类毒蘑菇造成的危害类型及中毒特点反馈给医院,对患者开展针对性的治疗。

2.1.2 临床表现及救治情况

主要临床表现为头晕、恶心、呕吐、四肢麻木等症状,主要症状为恶心(60%,3/5)、呕吐(100%,5/5)、昏迷(40%,2/5)、神志不清(80%,4/5)。潜伏期:0.5~4.5 h,平均2.5 h。5名患者具体潜伏期、临床表现、实验室辅助检测结果及临床救治情况如下:

病例3就餐0.5 h后出现多次非喷射状呕吐,1 h后出现神志丧失、中度昏迷,四肢麻木,肌张力减低,肌酸激酶同工酶达到26 IU/L,同型半胱氨酸达到21.21 μmol/L,甘胆酸升高至3.2 mg/L,淋巴细胞数增高至 $3.9 \times 10^9/L$,纤维蛋白原下降为1.91 g/L,采用吸氧、洗胃、开通静脉通路,予以速尿剂、阿托品及营养支持治疗,用药后患儿心率升高至110次/min,治疗后仍处于昏迷状态,有病理征阳性,神经毒性表

现明显,于5月14日转院至赣州市第一附属医院护胃、利尿后苏醒,于5月16日痊愈出院。

病例1就餐4h后出现恶心、呕吐症状,4.5h后出现神志不清、烦躁不安症状,既往有高血压病史,单核细胞数升高为 $1.49 \times 10^9/L$,纤维蛋白原下降为 $1.74 g/L$,白细胞数上升至 $14 \times 10^9/L$,同型半胱氨酸达到 $18.26 \mu mol/L$,无病理性特征改变,入院后急诊科立即进行了洗胃,之后入院进行了护胃、通便、导泻、营养支持、连续性血液净化治疗(CRRT),嗜睡1d后神志清晰,无恶心、呕吐症状,经过3d住院观察后,无明显不适,于5月16日痊愈出院。

病例5就餐后1h后出现多次呕吐,1.5h后出现神志不清,浅度昏迷,肌张力增高,白细胞数上升为 $13.24 \times 10^9/L$,甘胆酸上升为 $3.7 mg/L$,肌酸激酶同工酶上升为 $28 IU/L$,乳酸脱氢酶上升为 $289 IU/L$,纤维蛋白原下降为 $1.87 g/L$,予以吸氧,在CRRT血透过程中心率下降至 $54 \text{次}/\text{min}$ 后给予静推阿托品后心率上升为 $110 \text{次}/\text{min}$,给予洗胃、补液后未见明显好转,于5月14日转院至赣州市第一附属医院护胃、利尿后苏醒,于5月16日痊愈出院。

病例2就餐0.5h后出现恶心、多次呕吐等症状,4h后出现神志不清、精神变差、大小便失禁等症状,无既往病史,纤维蛋白原下降为 $1.0 g/L$,白细胞数上升为 $14.23 \times 10^9/L$,甘胆酸上升为 $6.2 mg/L$,同型半胱氨酸上升为 $41.85 \mu mol/L$,二氧化碳分压上升为 53.26 mmHg ,病情较重,急诊科给予洗胃治疗后,进行CRRT、抑酸护胃、导泻、补液等治疗,进行CRRT过程中出现心率下降为 $45 \text{次}/\text{min}$ 后考虑

中毒性休克给予阿托品、去甲肾上腺素治疗,有呼吸系统衰竭症状,建议CRRT继续治疗、暂不用激素治疗,5月11日经过救治无明显好转情况下,于5月12日转院至赣州市第一附属医院重症加强护理病房(ICU)进行CRRT血透治疗,抑酸护胃等观察治疗,于5月16日痊愈出院。

病例4就餐4.5h后出现恶心、呕吐症状,5h后出现轻微神志不清现象,单核细胞数升高为 $1.45 \times 10^9/L$,白细胞数上升至 $13.2 \times 10^9/L$,同型半胱氨酸达到 $17.26 \mu mol/L$,无病理性特征改变,入院后急诊科立即进行了洗胃,之后入院进行了护胃、通便、导泻、营养支持,休息一晚后神志清晰,无恶心、呕吐症状,经过1d住院观察后,无明显不适,于5月11日出院。

2.2 形态学鉴定

宁都县疾病预防控制中心接到卫生院信息后,立即组织人员前往患者居住地附近山上采摘可疑的有毒蘑菇,将不同种有毒蘑菇收集后让患者辨识,确定了他们采食的蘑菇品种。将采集的该品种样品进行拍照,详见图1。观察菌菇子实体中等大小,菌盖直径为 5 cm ,菌盖表面为浅褐色,中央色较深,边缘稍有内卷且具有较明显的条纹,甚至开裂。菌肉白色。菌褶白色,离生,较密,不等长。菌柄白色,表面光滑,长 $8 \sim 9 \text{ cm}$,粗 $1 \sim 1.2 \text{ cm}$,圆柱形,内部实心。基部膨大,近球状,菌托只残留痕迹或少数角形颗粒,菌柄中下部生有白色膜质菌环。网络图片显示麻面蘑菇菌柄中上部分也有类似菌环,菌盖部分有褐色细鳞片,形似麻点。残托鹅膏原型与



注:A:自行采摘的残托鹅膏图片;B:网络上显示的残托鹅膏图片;C:网络上显示的麻面蘑菇图片;D:书本上显示的残托鹅膏原型图片;E:书本上显示的残托鹅膏有环变种图片

图1 蘑菇形态

Figure 1 Morphological of mushroom

有环变种的其他部分类似,主要区别在于菌柄中下部有菌环。将本次事件的有毒蘑菇与相关书籍、网页的资料描述以及图片进行形态学比对,同时与麻面蘑菇进行比较,本次事件的有毒蘑菇菌柄中下部有菌环,与残托鹅膏有环变种类似,鉴定本案图片为神经型有毒蘑菇残托鹅膏有环变种 (*Amanita sychnopyraxis* f. *subannulata* Hongo), 详见图 1。

2.3 分子生物学鉴定

将 ITS 片段测序结果递交 NCBI 数据库进行比对, 比对结果显示为残托鹅膏有环变种, 匹配得分为 98%, 详见图 2。

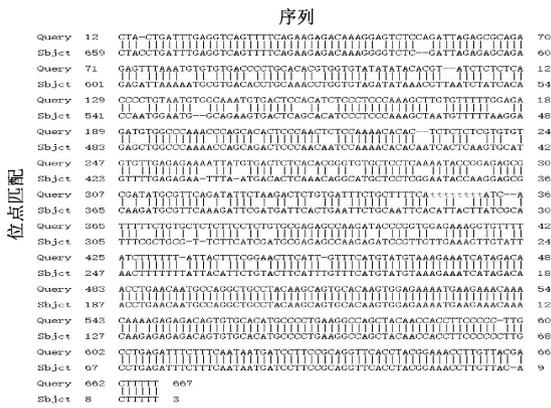


图 2 序列比对结果

Figure 2 Result of sequence alignment

2.4 进化树构建

应用 ITS 片段构建的残托鹅膏有环变种的系统

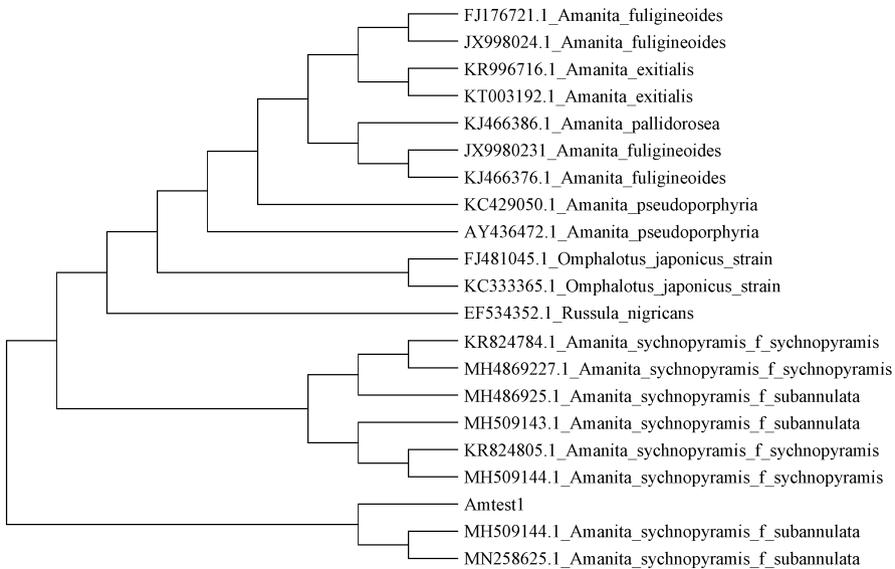


图 3 基于 ITS 序列构建的残托鹅膏有环变种系统发育树

Figure 3 Phylogenetic tree construction based on ITS fragment

3 讨论

我国已知的毒蘑菇有 430 余种, 隶属 39 个科, 已知的蘑菇毒素有 30 多种^[4]。据统计, 有毒动植物引起的食物中毒事件导致的中毒人数为食物中毒

发育树, 结果表明检测的样品 Amtest1 与残托鹅膏有环变种的 ITS 序列聚类到同一分支, 获得了较高的支持率, 鉴定样品为残托鹅膏有环变种, 详见表 1 和图 3^[3]。

表 1 用于残托鹅膏有环变种系统发育树分析的 ITS 片段信息
Table 1 ITS fragment informations for phylogenetic tree analysis

物种分类	代号	基因数据库命名
<i>Amanita fuliginoides</i>	HKAS52316	FJ176721
<i>Amanita fuliginoides</i>	HKAS52727	JX998024
<i>Amanita exitialis</i>	MHHNU30298	KR996716
<i>Amanita exitialis</i>	MHHNU30297	KT003192
<i>Amanita pallidorosea</i>	HKAS77327	KJ466386
<i>Amanita fuliginea</i>	HKAS75780	JX998023
<i>Amanita fuliginea</i>	HKAS77132	KJ466376
<i>Amanita pseudoporphyria</i>	HKAS56984	KC429050
<i>Amanita pseudogemmata</i>	HKAS38371	AY436472
<i>Omphalotus japonicus</i>	—	FJ481045
<i>Omphalotus japonicus</i>	HKAS56022	KC333365
<i>Russula nigricans</i>	MHHNUZP7003	EF534352
<i>Amanita sychnopyraxis</i> f. <i>sychnopyraxis</i>	HKAS84823	KR824784
<i>Amanita sychnopyraxis</i> f. <i>sychnopyraxis</i>	HKAS83454	MH486927
<i>Amanita sychnopyraxis</i> f. <i>subannulata</i>	HKAS101442	MH486925
<i>Amanita sychnopyraxis</i> f. <i>subannulata</i>	HKAS75485	MH509143
<i>Amanita sychnopyraxis</i> f. <i>sychnopyraxis</i>	HKAS84823	KR824805
<i>Amanita sychnopyraxis</i> f. <i>sychnopyraxis</i>	HKAS83454	MH509144
<i>Amanita sychnopyraxis</i> f. <i>subannulata</i>	HKAS101442	MH508633
<i>Amanita sychnopyraxis</i> f. <i>subannulata</i>	HFJAU0338	MN258625

注: —为物种在 GenBank 数据库中无相应的代号

报告的第二位, 而导致死亡的人数最多^[5]。野生可食用蘑菇与有毒蘑菇表面特征上十分相似, 需要专业人员才能进行较为准确的鉴定, 一般居民很难分辨, 同时因为野生蘑菇的杂生现象导致蘑菇中毒, 这也是近年来我国有毒蘑菇中毒事件频发的原

因,我国目前引起死亡的有毒蘑菇以担子菌为主^[6]。

江西省地处我国丘陵地带,与湖南省类似^[7],处于亚热带,光、热、水资源丰富,生态环境非常适合野生蘑菇的生长,故江西省有毒蘑菇中毒事件时有发生,统计数据 displays,2012—2017年,江西省报告野生毒蘑菇中毒事件120起,发病人数463人,死亡人数19人,病死率为4.1%^[8],是我国毒蘑菇中毒高发地区之一。

残托鹅膏有环变种又称残托斑鹅膏或残托斑毒伞,多生长于野外,夏季容易在马尾松林地上成群生长,菌盖表面浅褐色至棕褐色,中央色更深,散布有白色至污白色角锥状鳞片,边缘稍有内卷而具有较明显的条纹,有的开裂,其中毒症状有恶心、呕吐、头晕、头痛、精神错乱、多汗、流涎、瞳孔缩小、昏迷、肝损害、肾功能衰竭,严重者可致死亡,引起中毒的物质暂不明确。毒蘑菇中毒临床表现较为复杂,目前根据临床分型主要分为以下六类:胃肠炎型、神经精神型、溶血型、肝脏损害型、呼吸循环系统衰竭型和光过敏性皮炎型,残托鹅膏有环变种主要引起精神错乱,故一般分类为神经精神型有毒蘑菇。该菌是我国广西首次发现的一种毒蘑菇,后来在贵州、云南、福建等地区也有发现。其中毒病例在近年来被多次报道,2011年,广东省广州市发生首起误食残托斑鹅膏菌的中毒事件^[9],2014年江西报道15人误食残托斑鹅膏菌引起中毒的事件^[10]。本次事件中,流行病学调查显示,患者食用的食物除蘑菇外出现中毒症状的可能性不大,结合临床表现,患者中毒后主要症状为恶心、呕吐、神志不清甚至昏迷等症状,平均潜伏期为2.5h,潜伏期较短,呕吐后约0.5h即表现为神经中毒症状且5人食用后均先后发病,临床辅助检测指标中白细胞数、同型半胱氨酸等指标检查等均出现了异常,提示为毒蘑菇引起的食物中毒。对收集的样品进行形态学与分子生物学方法鉴定,形态学上有毒蘑菇与残托鹅膏有环变种对应,ITS菌种鉴定方法比对结果以及系统发育树鉴定结果均显示为残托鹅膏有环变种,故确定误食的毒蘑菇为残托鹅膏有环变种。毒蘑菇传统的鉴定方法主要依据外部形态、内部结构和显微特征等,因真菌物种形态特征差异不是非常明显而使得该方法十分滞后。分子生物学DNA标记方法核糖体大亚基(nLSU)、ITS已广泛应用于有毒蘑菇的种类鉴定,随着国际生物条形码计划的启动,高等真菌DNA条形码研究已经取得一定进展,一致认为ITS是高等真菌分类鉴定的有效DNA条形码^[11]。本次事件中,采用目前国际上的DNA条

形码技术对毒蘑菇进行了分析,并结合系统发育树构建确定了本次中毒的有毒蘑菇种类。

本次事件再次表明,仅仅凭借经验进行野生蘑菇采食往往会引起毒蘑菇中毒,因野生有毒蘑菇和可食用蘑菇在形态上往往较为相近,需经过专业训练才能进行较好地辨识。本次事件中患者将残托鹅膏有环变种与俗称的“麻面菇”相混淆。经询问调查,“麻面菇”即麻脸蘑菇,该菌可食用,子实体较大,菌盖偏淡黄色、盖上有褐色细鳞片,形似麻点,与残托鹅膏菌盖上的浅褐色肉眼较难区分,两种菌菌肉、菌柄均为白色,且都有菌环,故较难区分,尤其是年纪较大的采食者。本次事件引起5人中毒,从患者食用菌量与临床发病潜伏期、临床症状强弱分析,本次毒蘑菇中毒严重程度与有毒蘑菇食用量可能呈正相关。

本次事件提示江西省有毒蘑菇中毒事件的防控形势依然较为严峻,为避免此类事件再次发生,有关部门应加强宣传教育和监管,及时通过媒体等方式向群众宣传有毒野生蘑菇的知识,尤其是农村地区村民、儿童相关知识的普及,可通过乡村医生、发放宣传资料等方式进行预防,鼓励村民到市场上购买人工培养的蘑菇,避免采食野生蘑菇。

参考文献

- [1] 周厚德,刘洋,游兴勇,等.江西省铅山县一起蘑菇中毒事件的调查与鉴定[J].中国食品卫生杂志,2018,30(5):501-504.
- [2] 陈作红,杨祝良,图力古尔,等.毒蘑菇识别与中毒防治[M].北京:科学出版社,2017:187-188.
- [3] 章铁哲,孙承业,李海蛟,等.一起蘑菇致急性中毒事件的现场调查与鉴定[J].中国急诊医学杂志,2016,25(8):1012-1015.
- [4] 郎楠,吴黎明,李海蛟,等.山西河津一起毒蘑菇中毒事件调查分析[J].中华急诊医学杂志,2016,25(8):1007-1011.
- [5] 李光辉,孙思胜,郭卫芸,等.2009—2015年全国食物中毒特征分析[J].食品工业,2017,38(6):205-207.
- [6] 彭淑娟,李承军,庄原苏,等.鹅膏菌中毒的诊断和治疗[J].浙江医学,2014,36(24):2049-2051.
- [7] 梁进军,史文佩,段宏波,等.2014—2016年湖南省毒蕈中毒的局部空间回归分析[J].中国食品卫生杂志,2018,30(5):504-509.
- [8] 游兴勇,周厚德,刘洋,等.2012—2017年江西省毒蘑菇中毒事件流行病学分析[J].中国食品卫生杂志,2019,31(6):588-591.
- [9] 马晓薇,邓旺秋,李泰辉,等.一起误食残托斑鹅膏菌引起中毒的调查报告[J].医学动物防制,2013,29(1):85-88.
- [10] 魏雄杰,余平,蒋庆,等.一起误食残托斑鹅膏食物中毒调查[J].浙江预防医学,2016,28(10):1026-1028.
- [11] 陈作红.2000年以来有毒蘑菇研究新进展[J].菌物学报,2014,33(3):493-516.